

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.03.008
文章编号: 1005-8982 (2023) 03-0048-09

实验研究·论著

MicroRNA-133b调节FGFR1-ERK1/2-SOX2 信号通路对裸鼠肺癌NCI-H1975细胞 移植瘤生长的影响*

褚翔鹏¹, 万人安¹, 王鹏¹, 韩浩¹, 陈小波²

[1.日照市人民医院 胸外科, 山东 日照 276800; 2.云南省肿瘤医院
(昆明医科大学第三附属医院) 胸外一科, 云南 昆明 650118]

摘要: 目的 探讨microRNA-133b(miR-133b)对裸鼠肺癌NCI-H1975细胞移植瘤生长的抑制作用以及对成纤维细胞生长因子受体1-细胞外信号调节激酶1/2-性别决定区Y-box蛋白2信号通路(FGFR1-ERK1/2-SOX2)的影响。**方法** qRT-PCR检测人肺成纤维细胞、肺癌细胞株miR-133b表达。miR-133b过表达NCI-H1975细胞。将NCI-H1975细胞分为对照组、mimic NC组、miR-133b mimic组、miR-133b mimic+pcDNA3.1组、miR-133b mimic+pcDNA3.1 FGFR1组。CCK-8法检测NCI-H1975细胞增殖抑制率, Transwell实验观察NCI-H1975细胞侵袭、迁移情况。复制裸鼠移植瘤模型并分组, 将裸鼠分为对照组、mimic NC组、miR-133b mimic组、miR-133b mimic+AZD4547组, 观察各组裸鼠肿瘤体积与重量, HE染色观察各组裸鼠肿瘤组织变化, TUNEL检测肿瘤组织细胞凋亡情况, 免疫组化观察裸鼠肿瘤组织Ki-67、Cyclin D1、VEGF-A的表达, Western blotting检测各组肿瘤组织FGFR1、p-ERK1/2/ERK1/2、SOX2蛋白相对表达量。**结果** 与人肺成纤维细胞HLF- α 比较, 肺癌细胞株NCI-H1975、A427、NGE-1、A549中miR-133b mRNA相对表达量降低($P < 0.05$), 其中以NCI-H1975细胞中miR-133b mRNA相对表达量最低。miR-133b mimic组miR-133b mRNA相对表达量较对照组和mimic NC组升高($P < 0.05$)。miR-133b可通过负调控FGFR1抑制肺癌NCI-H1975细胞增殖和迁移。miR-133b mimic组移植瘤重量较对照组降低、体积缩小, miR-133b mimic+AZD4547组移植瘤重量较miR-133b mimic组降低、体积缩小($P < 0.05$)。miR-133b mimic组空泡样变性程度较对照组、mimic NC组减轻($P < 0.05$), miR-133b mimic+AZD4547组空泡样变性程度较miR-133b mimic组减轻($P < 0.05$)。miR-133b mimic组肿瘤组织细胞凋亡率较对照组升高($P < 0.05$), miR-133b mimic+AZD4547组肿瘤组织细胞凋亡率较miR-133b mimic组升高($P < 0.05$)。miR-133b mimic组VEGF-A、Cyclin D、Ki-67阳性细胞比例较对照组降低($P < 0.05$), miR-133b mimic+AZD4547组VEGF-A、Cyclin D、Ki-67阳性细胞比例较miR-133b mimic组降低($P < 0.05$)。miR-133b mimic组FGFR1、p-ERK1/2/ERK1/2、SOX2蛋白相对表达量较对照组降低($P < 0.05$), miR-133b mimic+AZD4547组FGFR1、p-ERK1/2/ERK1/2、SOX2蛋白相对表达量较miR-133b mimic组降低($P < 0.05$)。**结论** miR-133b过表达可能通过抑制FGFR1-ERK1/2-SOX2轴, 抑制裸鼠肺癌NCI-H1975细胞移植瘤生长。

关键词: 肺癌; microRNA-133b; 皮下移植瘤; 裸鼠; 成纤维细胞生长因子受体1; 细胞外信号调节激酶1/2; 性别决定区Y-box蛋白2

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Influence of microRNA-133b on growth of lung cancer cell transplanted tumor in nude mice by regulating FGFR1-ERK1/2-SOX2 signaling pathway*

收稿日期: 2022-08-27

* 基金项目: 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资金(No: 2018FE-001-252)

Chu Xiang-peng¹, Wan Ren-an¹, Wang Peng¹, Han Hao¹, Chen Xiao-bo²

[1. Department of Thoracic Surgery, Rizhao people's Hospital, Rizhao, Shandong 276800, China;

2. Department of Thoracic Surgery, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University (Yunnan Cancer Hospital), Kunming, Yunnan 650118, China]

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of miR-133b on the growth of lung cancer NCI-H1975 cells subcutaneously transplanted tumor in nude mice and its influence on fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) -extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) -sex-determining region Y-box protein 2 (SOX2) signaling pathway. **Methods** Human lung fibroblasts HLF- α and lung cancer cells NCI-H1975, A427, NGE-1, and A549 were cultured in vitro, the expression level of miR-133b was detected by qRT-PCR, and the cell line with the lowest expression of miR-133b was selected as the research cell line; NCI-H1975 cells were divided into control group, mimic group, miR-133b mimic group, miR-133b mimic+pcDNA3.1 group, and miR-133b mimic+pcDNA3.1 FGFR1 group. The proliferation inhibition rate of NCI-H1975 cells was detected by CCK-8, and the invasion and migration of NCI-H1975 cells were measured by Transwell chamber method. MiR-133b mimic and mimic NC were transfected into NCI-H1975 cell line, and a certain amount of NCI-H1975 cells were taken for routine culture. NCI-H1975 cells in logarithmic growth phase were digested and injected into BALB/C nude mice. After tumor formation, nude mice were injected with serum-free medium, mimic NC, miR-133b mimic, and miR-133b mimic+FGFR1 inhibitor (AZD4547), respectively, as control group, mimic NC group, miR-133b mimic group, and miR-133b mimic+ AZD4547 group, respectively. The tumor volume and weight in each group were observed; HE staining was performed to observe the change of tumor tissue; TUNEL was performed to measure tumor cell apoptosis; immunohistochemistry was performed to measure the expression of Ki-67, CyclinD1, and VEGF-A in mouse tumor tissue; western blot was performed to determine the levels of FGFR1-ERK1/2-SOX2 pathway-related proteins in tumor tissues of each group. **Results** Compared with human lung fibroblasts HLF- α , the levels of miR-133b in lung cancer cell lines NCI-H1975, A427, NGE-1, and A549 were decreased ($P < 0.05$), and the expression of miR-133b in NCI-H1975 cell line was lowest; miR-133b negatively regulates FGFR1 to inhibit proliferation and metastasis of lung cancer NCI-H1975 cells. Compared with the control group, the tumor tissue of nude mice in the miR-133b mimic group had less vacuolar degeneration, and the tumor weight, tumor volume, tumor cell apoptosis rate, positive expression rates of Ki-67, Cyclin D1, VEGF-A, and the levels of FGFR1, p-ERK1/2/ERK1/2, and SOX2 decreased at the time of sacrifice ($P < 0.05$); compared with the miR-133b mimic group, the degree of vacuolar degeneration of nude mice in the miR-133b mimic+AZD4547 group was reduced, the tumor weight and volume, tumor cell apoptosis rate, positive expression rates of Ki-67, Cyclin D1, VEGF-A, the levels of FGFR1, p-ERK1/2/ERK1/2, and SOX2 decreased at the time of sacrifice ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of miR-133b may inhibit the growth of lung cancer NCI-H1975 cells subcutaneously transplanted tumor in nude mice by inhibiting the FGFR1-ERK1/2-SOX2 axis.

Keywords: lung neoplasms; microRNA-133b; subcutaneous transplant tumor; nude mice; fibroblast growth factor receptor 1; extracellular signal-regulated kinase 1/2; sex-determining region Y-box protein 2

肺癌是指气管、支气管、肺部的恶性肿瘤，其中腺癌占比最高，肺癌发病率、病死率均较高，属于重大公共卫生问题^[1-2]。MicroRNA (miRNA) 在肿瘤中发挥的作用众所周知，miRNA可通过影响肿瘤的增殖、凋亡、浸润等参与肿瘤的恶性进展^[3-5]。MicroRNA-133b (miR-133b) 在包括肺癌在内的多种肿瘤中异常表达，如miR-133b在胃肠道间质瘤中下调^[6]；miR-133b可抑制人类抗原R，克服前列腺癌细胞的化疗耐药性^[7]；miR-133b可通过靶向PKM2基因促进肺癌A549干细胞增殖，并降低

A549细胞药物敏感性^[8]。前期试验表明，体外试验中miR-133b在肺癌细胞中异常低表达，有关miR-133b在肺癌体内研究仍缺乏，因此本研究重点探讨miR-133b在肺癌裸鼠移植瘤中的抑瘤作用，并初步探讨相关机制。WANG等^[9]研究表明，FGFR1-ERK1/2-SOX2轴为信号促进FGFR1促进肺癌细胞增殖、上皮间质转化和转移。前期体外试验中，miR-133b可通过靶向负调控FGFR1抑制肺癌NCI-H1975细胞增殖和转移，生物信息网站分析可知miR-133b与FGFR1存在结合位点，FGFR1-

ERK1/2-SOX2 在肺癌裸鼠移植瘤中如何表达、且与 miR-133b 的关系将是本研究研讨的内容。

1 材料与方法

1.1 动物、细胞与试剂

SPF 级 BALB/C 雄性裸鼠 40 只[SCXK(苏)2021-0013]购自常州卡文斯实验动物有限公司。人肺成纤维细胞 HLF- α (BFN6021545)、肺癌细胞株 NCI-H1975 (BFN608006102)、A427 (BFN60870154)、NGE-1 (BFN60808930)、A549 (BFN608007142) 购自青旗(上海)生物技术发展有限公司。miR-133b mimic、mimic NC 由生工生物工程(上海)股份有限公司构建,FGFR1 抑制剂——AZD4547 (S2801) 购自上海 Selleck 生物科技有限公司,CCK-8 试剂盒 (C0037)、TUNEL 试剂盒 (C1091)、HE 染色试剂盒 (C0105S) 购自上海碧云天生物技术有限公司,总 RNA 抽提试剂盒 (12183016)、逆转录试剂盒 (4366597)、总蛋白提取试剂盒 (89842) 购自赛默飞世尔(上海)科技公司, Ki-67 (GTX16667)、Cyclin D1 (GTX27958)、VEGF-A (GTX21316)、FGFR1 (GRX10646)、p-ERK1/2 (GTX635617)、ERK1/2 (GTX134462)、SOX2 (GTX101507)、GAPDH (GTX124502) 抗体购自美国 GeneTex 公司,山羊抗兔 (ab6721) 购自美国 Abcam 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 qRT-PCR 检测人肺成纤维细胞、肺癌细胞株 miR-133b 表达 提取人肺成纤维细胞 HLF- α 、肺癌细胞株 NCI-H1975、A427、NGE-1、A549 细胞总 RNA,将 2 μ g RNA 逆转录,cDNA 稀释至 50 ng/ μ L 上样。反应体系:共 10 μ L, miScript SYBR[®] Green Mix 5 μ L, cDNA (50 ng/ μ L) 1 μ L, 正反向引物各 0.5 μ L, ddH₂O 3.0 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 共 38 个循环。以 U6 为对照, 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算目的基因 miR-133b mRNA 相对表达量。见表 1。

1.2.2 荧光显微镜下观察各组细胞的 miR-133b 转染效率 体外培养 NCI-H1975 细胞,于高糖 DMEM 培养基(添加 10% 胎牛血清)中培养细胞,并置于 5% 二氧化碳培养箱中,设置温度为 37 $^{\circ}$ C,每 2 天更换培养基,待细胞生长至 80% 左右时进行传代。转染前 1 天,消化细胞并调整细胞浓度至 2 \times 10⁵ 个/mL,接

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列	引物长度/bp
miR-133b	正向: 5'-TGGACAGTTACGCGCACAT-3'	19
	反向: 5'-CGAGTAGGACATGCTGTAGGT-3'	21
U6	正向: 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTG-3'	19
	反向: 5'-CACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	19

种在 6 孔板上,细胞贴壁至 80% 左右进行转染,通过 Lipofectamine 3000 试剂盒分别转染 mimic NC 和 miR-133b mimic 作为 mimic NC 组和 miR-133b mimic 组,另常规培养细胞作为对照组。培养 24 h 后,荧光显微镜下观察转染效率,转染效率 (%) = 阳性细胞数/总细胞数。

1.2.3 miR-133b 过表达调控 FGFR1 对肺癌细胞 NCI-H1975 细胞增殖、迁移的影响 将 NCI-H1975 细胞分为对照组、mimic NC 组、miR-133b mimic 组、miR-133b mimic+pcDNA3.1 组、miR-133b mimic+pcDNA3.1 FGFR1 组。CCK-8 法检测各组 NCI-H1975 细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 (%) = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照组 OD 值 \times 100%。Transwell 实验检测 NCI-H1975 细胞侵袭、迁移。细胞侵袭:于 Transwell 小室中添加 Matrigel, 37 $^{\circ}$ C 固化 3 h,加入 NCI-H1975 细胞 (5 \times 10⁴ 个),下室中添加 RPMI 1640 培养基(含血清,500 μ L),培养箱中培养 48 h,经多聚甲醛(4%)固定,0.1% 结晶紫染色,光学显微镜下观察。细胞迁移:实验步骤除不加入 Matrigel 胶外其余步骤均同侵袭试验。通过 Targetscan 网站预测 miR-133b 与 FGFR1 结合位点。

1.2.4 人肺癌裸鼠移植瘤模型复制并分组 取对数生长期细胞消化后,离心弃上清,计数,调整细胞密度,各组小鼠均在后背部接种 4 \times 10⁶ 个细胞,待肿瘤体积变大至 100 mm³ 时,将裸鼠分为对照组、mimic NC 组、miR-133b mimic 组、miR-133b mimic+AZD4547 组,每组 10 只。mimic NC 组、miR-133b mimic 组、miR-133b mimic+AZD4547 组采用 5 点注射法注射转染试剂(100 μ L),对照组以无血清培养基代替,miR-133b mimic+AZD4547 组再额外注射 12.5 mg/kg AZD4547^[10]。1 次/5 d,共 4 次。观察各组小鼠一般状况。

1.2.5 HE 染色观察肿瘤组织变化 小鼠最后 1 次观测后断头处死,剥离肿瘤,称重并测量肿瘤体

积, 肿瘤体积=1/2(长径×短径²), 将肿瘤置于多聚甲醛中固定, 制备石蜡切片。脱蜡水化后, 经HE染色试剂盒进行染色、脱水、透明、封片后, 光学显微镜下观察肿瘤组织变化情况。

1.2.6 TUNEL检测肿瘤细胞凋亡 取石蜡切片, TUNEL细胞凋亡试剂盒进行肿瘤细胞的凋亡检测, 光学显微镜下观察, 棕黄色染色代表凋亡细胞。凋亡率(%)=(阳性细胞数/总细胞数)×100%。

1.2.7 免疫组织化学法观察小鼠肿瘤组织 VEGF-A、Cyclin D、Ki-67表达 对石蜡切片进行脱水(梯度法: 100%无水乙醇、95%乙醇、90%乙醇、85%乙醇、70%乙醇), 抗原修复(枸橼酸钠), H₂O₂封闭, 山羊血清封闭, 添加VEGF-A、Cyclin D、Ki-67兔源一抗(稀释比分别为1:20、1:500、1:500), 清洗后添加山羊抗兔二抗, DAB显色, 苏木精复染、分化、反蓝、水化、透明、封片, 光学显微镜下观察。

1.2.8 Western blotting检测FGFR1、p-ERK1/2、ERK1/2、SOX2蛋白相对表达量 称量100 mg移植瘤组织, 眼科剪剪碎, 加入预冷裂解液匀浆器内匀浆, 转移至离心管内, 离心(12 000 r/min, 15 min)取上清液, 置入-80℃冰箱冷冻保存待用。BCA试剂盒测定蛋白浓度。SDS-PAGE凝胶电泳, 转膜至PVDF膜上, 封闭, 加入稀释一抗FGFR1、p-ERK1/2、ERK1/2、SOX2, 稀释比分别为1:200、1:200、1:200、1:400, 以GAPDH(1:5 000)为内参, 封闭, 24 h加山羊抗兔二抗(1:5 000), 封闭, ECL显色液, 分析FGFR1、p-ERK1/2/ERK1/2、SOX2蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 22.0统计软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较用t检验; 多组间比较用方差分析, 进一步两两比较用LSD-t检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各细胞miR-133b表达的比较

人肺成纤维细胞 HLF-α, 肺癌细胞株 NCI-H1975、A427、NGE-1、A549 中 miR-133b mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义(P<0.05), 与人肺成纤维细胞 HLF-α 比较, 肺癌细胞株 NCI-H1975、A427、NGE-1、A549 中 miR-133b mRNA 相对表达量均降低(P<0.05), 其中 NCI-H1975 细胞中 miR-133b

mRNA 相对表达量最低, 本研究选择 NCI-H1975 细胞作为研究细胞。见表2。

表2 各细胞miR-133b表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-133b mRNA
HLF-α	1.02 ± 0.12
NCI-H1975	0.16 ± 0.02 [†]
A427	0.52 ± 0.06 [†]
NGE-1	0.74 ± 0.09 [†]
A549	0.46 ± 0.05 [†]
F值	106.965
P值	0.000

注: †与HLF-α比较, P<0.05。

2.2 miR-133b过表达NCI-H1975细胞

对照组、mimic NC组、miR-133b mimic组 miR-133b mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义(P<0.05), miR-133b mimic组 miR-133b mRNA 相对表达量较对照组和mimic NC组升高(P<0.05)(见表3)。miR-133b mimic组的miR-133b转染效率较高, 提示构建的转染细胞株成功(见图1)。

表3 各组细胞的miR-133b转染效率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-133b mRNA
对照组	1.02 ± 0.12
mimic NC组	1.01 ± 0.12
miR-133b mimic组	3.17 ± 0.39 ^{①②}
F值	154.033
P值	0.000

注: ①与对照组比较, P<0.05; ②与mimic NC组比较, P<0.05。

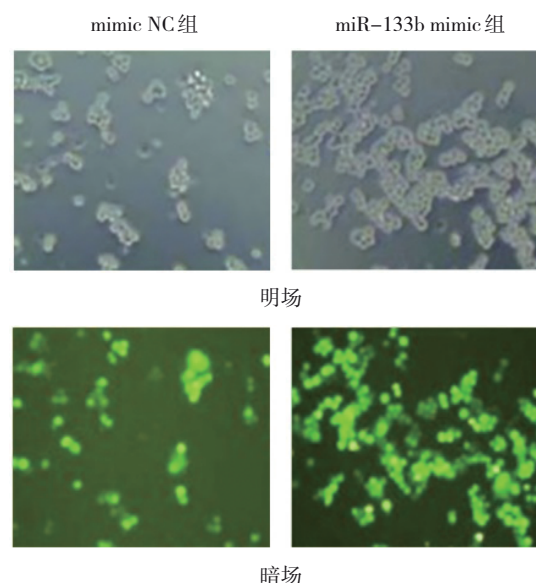


图1 荧光显微镜下观察的转染效率

2.3 miR-133b 调控 FGFR1 对 NCI-H1975 细胞增殖、侵袭、迁移的影响

各组细胞增殖抑制率、侵袭细胞数、迁移细胞数比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),与对照组比较,miR-133b mimic 组增殖抑制率升高($P < 0.05$),侵袭细胞数、迁移细胞数降低($P < 0.05$);

与 miR-133b mimic 组比较,miR-133b mimic+pcDNA3.1 FGFR1 组增殖抑制率降低($P < 0.05$),侵袭细胞数、迁移细胞数增加($P < 0.05$)(见表 4 和图 2)。生信网站预测显示,miR-133b 与 FGFR1 存在靶向关系(见图 3)。

表 4 各组细胞增殖抑制率、侵袭细胞数、迁移细胞数的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	增殖抑制率/%	侵袭细胞数/个	迁移细胞数/个
对照组	0	135.41 ± 19.34	222.72 ± 31.80
mimic NC 组	0.54 ± 0.07	136.67 ± 19.52	234.38 ± 33.48
miR-133b mimic 组	32.71 ± 4.67 ^①	66.53 ± 9.50 ^①	85.62 ± 12.24 ^①
miR-133b mimic + pcDNA3.1 组	31.72 ± 4.51	67.76 ± 9.63	87.36 ± 12.48
miR-133b mimic + pcDNA3.1 FGFR1 组	18.24 ± 2.62 ^②	95.54 ± 13.65 ^②	132.58 ± 18.95 ^②
F 值	154.056	31.866	55.638
P 值	0.000	0.000	0.000

注:①与对照组比较, $P < 0.05$;②与 miR-133b mimic 组比较, $P < 0.05$ 。

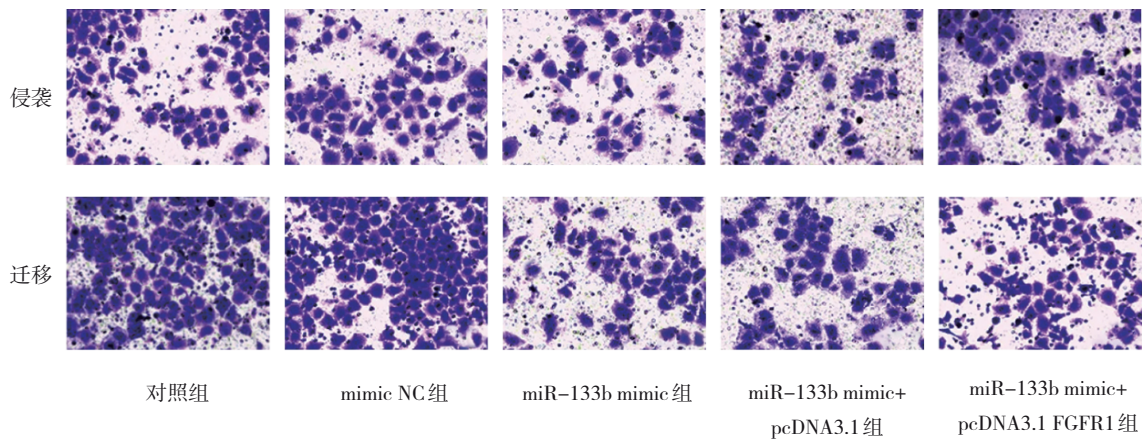


图 2 各组细胞侵袭、迁移情况

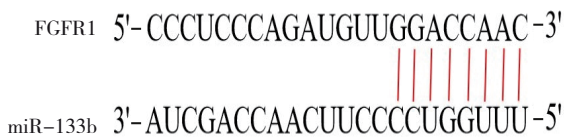


图 3 Targetscan 网站预测 FGFR1 与 miR-133b 的关系

2.4 各组裸鼠成瘤后情况

裸鼠成瘤后,逐渐萎靡不振,摄食、饮水量均减少,消瘦,皮毛晦暗,双目呆滞,行动缓慢;转染干预后,miR-133b mimic 组裸鼠症状较 mimic NC 组和对对照组轻,miR-133b mimic+AZD4547 组症状较 miR-133b mimic 组轻。肺癌细胞裸鼠皮下移植瘤均复制成功,成功率 100%。

2.5 各组裸鼠移植瘤体积和重量的比较

对照组、mimic NC 组、miR-133b mimic 组、miR-133b mimic+AZD4547 组裸鼠处死时移植瘤重量和体积比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。miR-133b mimic 组移植瘤重量较对照组降低,体积缩小($P < 0.05$),miR-133b mimic+AZD4547 组重量移植瘤较 miR-133b mimic 组降低,体积缩小($P < 0.05$)。见表 5 和图 4。

2.6 各组肺裸鼠移植瘤肿瘤组织病理变化

裸鼠皮下移植瘤与周围组织分界清晰,容易剥除。HE 染色结果显示,对照组、mimic NC 组肿瘤细胞空泡样变性明显、细胞结构消失、细胞红染,miR-133b mimic 组空泡样变性程度较对照组、

表5 各组裸鼠处死时移植瘤重量和体积的比较
($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	重量/g	体积/mm ³
对照组	0.52 ± 0.06	481.82 ± 60.21
mimic NC组	0.54 ± 0.07	523.61 ± 65.45
miR-133b mimic组	0.21 ± 0.02 ^①	182.74 ± 22.84 ^①
miR-133b mimic+AZD4547组	0.11 ± 0.01 ^②	124.62 ± 13.11 ^②
F值	126.311	115.676
P值	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与miR-133b mimic组比较, $P < 0.05$ 。

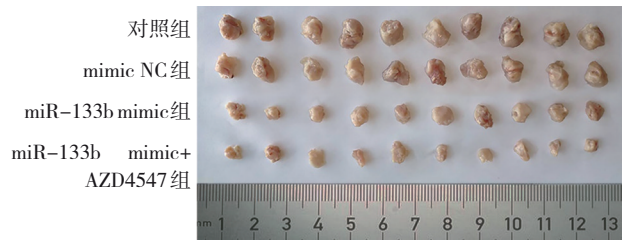


图4 各组裸鼠处死后肿瘤形态

miR-133b mimic+AZD4547组细胞病变程度较miR-133b mimic组轻。见图5。

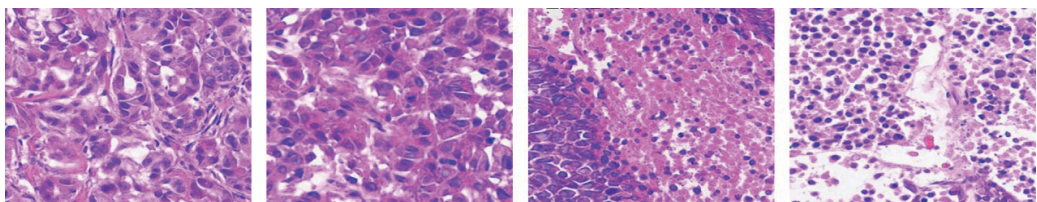


图5 各组肺癌裸鼠移植瘤肿瘤组织染色结果 (HE染色 × 400)

2.7 各组肺癌裸鼠移植瘤肿瘤组织细胞凋亡情况

各组肺癌裸鼠移植瘤组织细胞凋亡率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), miR-133b mimic组肿瘤组织细胞凋亡率较对照组升高 ($P < 0.05$); miR-133b mimic+AZD4547组较miR-133b mimic组肿瘤组织细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$)。见表6和图6。

表6 各组肺癌裸鼠移植瘤肿瘤组织细胞凋亡率比较
($n=10, \%, \bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率
对照组	18.24 ± 2.28
mimic NC组	19.72 ± 2.46
miR-133b mimic组	42.76 ± 6.34 ^①
miR-133b mimic+AZD4547组	51.72 ± 6.46 ^②
F值	72.108
P值	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与miR-133b mimic组比较, $P < 0.05$ 。

2.8 各组裸鼠肿瘤组织VEGF-A、Cyclin D1、Ki-67蛋白表达

免疫组织化学检测结果显示, VEGF-A定位于细胞浆, Ki-67、Cyclin D均定位于细胞核。miR-133b mimic组Ki-67、Cyclin D、VEGF-A阳性细胞比例较对照组低, miR-133b mimic+AZD4547组VEGF-

A、Cyclin D、Ki-67阳性细胞比例较miR-133b mimic组低。见图7。

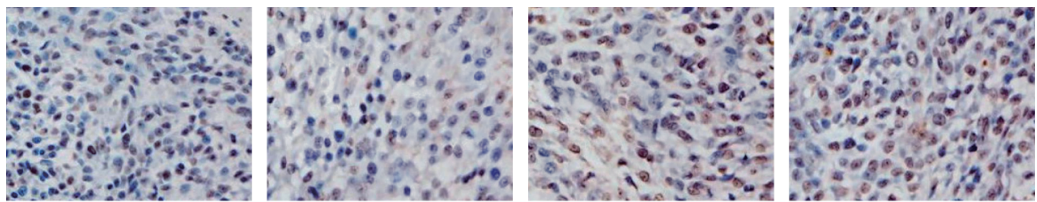


图6 各组肺癌裸鼠移植瘤肿瘤细胞凋亡情况 (TUNEL染色 × 400)

2.9 各组裸鼠肿瘤组织FGFR1、p-ERK1/2/ERK1/2、SOX2表达比较

各组裸鼠肿瘤组织FGFR1、p-ERK1/2/ERK1/2、

SOX2蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。miR-133b mimic组FGFR1、p-ERK1/2/ERK1/2、SOX2相对表达量较对照组降低 ($P <$

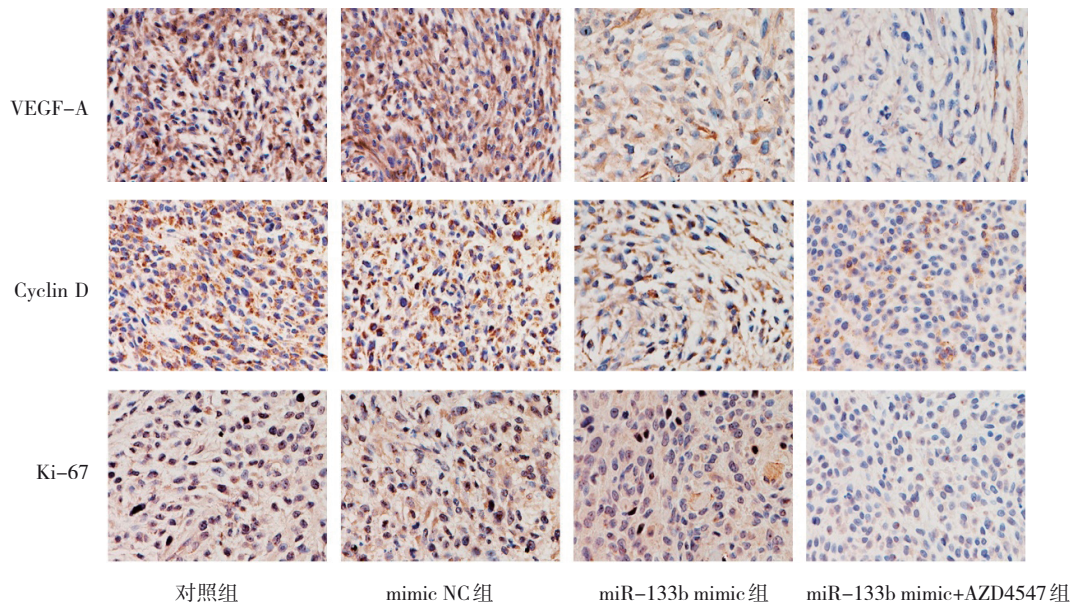


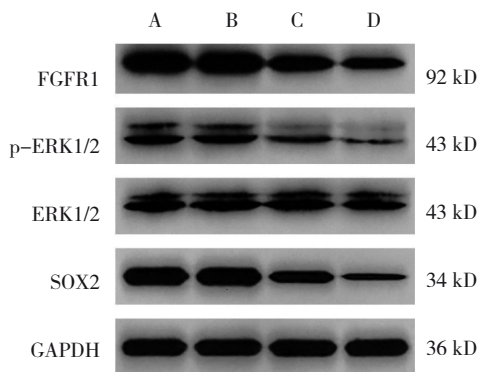
图 7 各组裸鼠肿瘤组织 VEGF-A、Cyclin D1、Ki-67 蛋白表达 (免疫组织化学 × 400)

0.05), miR-133b mimic+AZD4547 组 FGFR1、p-ERK1/2/ERK1/2、SOX2 相对表达量较 miR-133b mimic 组降低 ($P < 0.05$)。见表 7 和图 8、9。

表 7 各组裸鼠肿瘤组织 FGFR1、p-ERK1/2/ERK1/2、SOX2 蛋白相对表达量的比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	FGFR1	p-ERK1/2/ERK1/2	SOX2
对照组	2.03 ± 0.25	0.86 ± 0.11	1.38 ± 0.17
mimic NC 组	2.01 ± 0.25	0.84 ± 0.10	1.37 ± 0.17
miR-133b mimic 组	0.97 ± 0.12 ^①	0.25 ± 0.03 ^①	0.41 ± 0.05 ^①
miR-133b mimic+AZD4547 组	0.52 ± 0.09 ^②	0.13 ± 0.02 ^②	0.11 ± 0.03 ^②
F 值	93.671	151.453	440.435
P 值	0.000	0.000	0.000

注：①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 miR-133b mimic 组比较, $P < 0.05$ 。



A: 对照组; B: mimic NC 组; C: miR-133b mimic 组; D: miR-133b mimic+AZD4547 组。

图 8 各组裸鼠肿瘤组织各蛋白表达

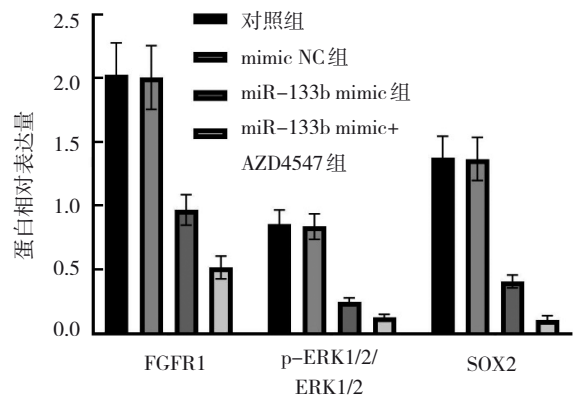


图 9 各组裸鼠肿瘤组织各蛋白相对表达量的比较

($n = 10, \bar{x} \pm s$)

3 讨论

肺癌是我国较常见的恶性肿瘤,治疗靶点的研究是永恒课题。随着miRNA在肿瘤领域的研究不断深入,许多miRNA被证实在肺癌中发挥作用。miR-133b在许多恶性肿瘤中发挥抑癌基因作用,miR-133b过表达可抑制人胃癌AGS细胞株增殖、迁移与侵袭^[14];miR-133b可通过CTGF调控卵巢癌上皮间质转化^[15];miR-133b通过靶向HOXA9抑制结肠直肠癌转移^[16];miR-133b可充当LncRNA HOXD-AS1与MMP9的中间桥梁参与非小细胞肺癌的迁移与侵袭^[17]。与人肺成纤维细胞HLF- α 比较,肺癌细胞株(NCI-H1975、A427、NGE-1、A549)中miR-133b表达均降低,其中NCI-H1975细胞中表达最低,因此本研究选取NCI-H1975细胞作为miR-133b与肺癌体内实验关系的研究细胞株。本研究细胞实验证实,miR-133b可通过负调控FGFR1抑制肺癌NCI-H1975细胞增殖及迁移,因此复制肺癌NCI-H1975细胞皮下移植瘤,待裸鼠成瘤后,裸鼠逐渐萎靡不振、摄食、饮水量减少,消瘦,皮毛晦暗,双目呆滞,行动缓慢,肿瘤体积、重量呈升高趋势,满足实验需求。裸鼠处死后,裸鼠肿瘤体积与重量均低于对照组与mimic NC组,证明miR-133b在体内也可发挥抑癌作用,与体外实验具有一致性^[17]。HE染色、TUNEL检测结果显示miR-133b mimics组空泡样变性程度、细胞凋亡率均降低,提示miR-133b过表达在抑制NCI-H1975裸鼠移植瘤皮下增长、促进凋亡中发挥关键作用。Cyclin D1、Ki67是细胞增殖相关蛋白,可作为评价细胞增殖状态指标,可在一定程度上反应肺癌细胞的恶性增殖。新生血管为肿瘤生长提供营养与通道,抑制新生血管的生成也是抑癌的主要手段之一,VEGF-A可促血管生成。本研究免疫组织化学检测结果发现,miR-133b过表达可降低VEGF-A、Cyclin D1、Ki67阳性表达,微血管密度降低,即miR-133b过表达可抑制NCI-H1975细胞体内增殖与新生血管生成而延缓肿瘤生长速度。

FGFR1在肺癌中被广泛研究,被认为是调控肺部肿瘤侵袭、迁移的关键靶点,其激活可增强肺部肿瘤干细胞样特性与抗凋亡能力,同时可观察到SOX2的上调^[18]。SOX2是肿瘤干性标志物,可调控肺癌的肿瘤生长,其激活可促进肿瘤的侵袭

转移^[19]。实体瘤的致死与肿瘤的侵袭转移关系密切。FGFR1上调SOX2的机制与其激活多种下游通路有关,MAPK是FGFR1的关键下游^[20]。FGFR1/MAPK在多种肿瘤细胞的生物学进展中属于关键一环。WANG等^[9]研究显示,FGFR1抑制可通过促使下游ERK1/2磷酸化而上调SOX2表达,促进肺癌细胞增殖。上皮间质转化与转移;LIN等^[21]研究显示,FGF21通过FGFR1-ERK1/2-Elk-1途径抑制HepG2细胞载脂蛋白的表达;FANG等^[22]研究显示,SOX2与FGFR1升高与小细胞肺癌患者的预后不良相关;本研究中,miR-133b过表达可降低p-ERK1/2、SOX2相对表达量,提示miR-133b过表达抑体内移植瘤的作用可能是通过FGFR1-ERK1/2-SOX2轴实现的,但具体机制仍待进一步分析。为此本研究通过瘤内注射FGFR1抑制剂AZD4547,发现AZD4547可进一步加大miR-133b过表达导致的抑瘤作用。因此笔者认为miR-133b过表达对裸鼠肺癌NCI-H1975细胞皮下移植瘤生长具有抑制作用,且可能是通过调控FGFR1-ERK1/2-SOX2信号通路实现的。

综上所述,miR-133b过表达可能通过抑制FGFR1-ERK1/2-SOX2轴,对裸鼠肺癌NCI-H1975细胞皮下移植瘤生长具有抑制作用。但本研究也存在一定不足,仅用FGFR1抑制剂验证了FGFR1在FGFR1-ERK1/2-SOX2中发挥的作用,下一步将继续尝试使FGFR1过表达观察小鼠肿瘤的变化,并对其下游机制进行充分验证。

参 考 文 献 :

- [1] 田广伟,李楠,李光.基于公共数据库分析PEG3基因在肺腺癌中的表达及预后意义[J].中国医科大学学报,2020,49(9):793-797.
- [2] GOBBI G, DONATI B, DO VALLE I F, et al. The hippo pathway modulates resistance to BET proteins inhibitors in lung cancer cells[J]. Oncogene, 2019, 38(42): 6801-6817.
- [3] JIANG Z Z, YIN J, PENG G Y, et al. Circ_0074027 contributes to the progression of non-small cell lung cancer via microRNA-362-3p/clathrin heavy chain axis[J]. Anticancer Drugs, 2021, 32(1): 1-10.
- [4] LI J L, PENG D D, XIE Y, et al. Novel potential small molecule-MiRNA-cancer associations prediction model based on fingerprint, sequence, and clinical symptoms[J]. J Chem Inf

- Model, 2021, 61(5): 2208-2219.
- [5] 刘乔, 姚丽, 张泓辰, 等. 人食管鳞状细胞癌中 miR-424 的差异表达及生物信息学分析[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(4): 557-562.
- [6] YAMAMOTO H, KOHASHI K, FUJITA A, et al. Fascin-1 overexpression and miR-133b downregulation in the progression of gastrointestinal stromal tumor[J]. Mod Pathol, 2013, 26(4): 563-571.
- [7] LIU H, SONG X L, HOU J Q, et al. Posttranscriptional regulation of human antigen R by miR-133b enhances docetaxel cytotoxicity through the inhibition of ATP-binding cassette subfamily G member 2 in prostate cancer cells[J]. DNA Cell Biol, 2018, 37(3): 210-219.
- [8] 米永华, 何苗, 刘北忠. miR-133b 靶向 *PKM2* 基因对肺癌 A549 干细胞增殖及药物敏感性的影响[J]. 中国肺癌杂志, 2017, 20(6): 376-381.
- [9] WANG K X, JI W X, YU Y F, et al. *FGFR1-ERK1/2-SOX2* axis promotes cell proliferation, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis in *FGFR1*-amplified lung cancer[J]. Oncogene, 2018, 37(39): 5340-5354.
- [10] 王凯旋. *FGFR1* 调控 *FGFR1* 扩增型肺癌增殖、上皮间质转化和转移的机制研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2018.
- [11] 王旭, 徐文举, 袁五营. miRNA-4262 通过靶向神经调节蛋白 1 调控非小细胞肺癌细胞增殖、侵袭、迁移的作用机制[J]. 癌症进展, 2020, 18(2): 133-137.
- [12] CHI Y B, ZHENG W L, BAO G Y, et al. Circular RNA circ_103820 suppresses lung cancer tumorigenesis by sponging miR-200b-3p to release *LATS2* and *SOCS6*[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(2): 185.
- [13] XIA H W, NIU Q L, DING Y G, et al. Long noncoding *HOXA11-AS* knockdown suppresses the progression of non-small cell lung cancer by regulating miR-3619-5p/*SALL4* axis[J]. J Mol Histol, 2021, 52(4): 729-740.
- [14] 卢运, 张文韬, 贲九洋, 等. miR-133b 基因转染对人胃癌细胞株 AGS 增殖、迁移及侵袭的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(10): 1025-1029.
- [15] YANG L, HOU J, CUI X H, et al. MiR-133b regulates the expression of CTGF in epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(24): 5602-5609.
- [16] WANG X, BU J Y, LIU X W, et al. miR-133b suppresses metastasis by targeting *HOXA9* in human colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(38): 63935-63948.
- [17] XIA H, JING H Y, LI Y, et al. Long noncoding RNA *HOXD-AS1* promotes non-small cell lung cancer migration and invasion through regulating miR-133b/*MMP9* axis[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 156-162.
- [18] TOSCHI L, FINOCCHIARO G, NGUYEN T T, et al. Increased *SOX2* gene copy number is associated with *FGFR1* and *PIK3CA* gene gain in non-small cell lung cancer and predicts improved survival in early stage disease[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e95303.
- [19] TENJIN Y, MATSUURA K, KUDOH S, et al. Distinct transcriptional programs of *SOX2* in different types of small cell lung cancers[J]. Lab Invest, 2020, 100(12): 1575-1588.
- [20] BOCKORNY B, RUSAN M, CHEN W K, et al. RAS-MAPK reactivation facilitates acquired resistance in *FGFR1*-amplified lung cancer and underlies a rationale for upfront FGFR-MEK blockade[J]. Mol Cancer Ther, 2018, 17(7): 1526-1539.
- [21] LIN X L, LI G H, HE X L, et al. *FGFR1* inhibits apolipoprotein(a) expression in HepG2 cells via the *FGFR1-ERK1/2-Elk-1* pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 393(1-2): 33-42.
- [22] YANG F, GAO Y N, GENG J S, et al. Elevated expression of *SOX2* and *FGFR1* in correlation with poor prognosis in patients with small cell lung cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(12): 2846-2854.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 褚翔鹏, 万人安, 王鹏, 等. MicroRNA-133b 调节 FGFR1-ERK1/2-SOX2 信号通路对裸鼠肺癌 NCI-H1975 细胞移植瘤生长的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(3): 48-56.

Cite this article as: CHU X P, WAN R A, WANG P, et al. Influence of microRNA-133b on growth of lung cancer cell transplanted tumor in nude mice by regulating FGFR1-ERK1/2-SOX2 signaling pathway[J]. China Journal of Modern Medicine, 2023, 33(3): 48-56.